

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Solu- ja molekyylibiologia

2015

Sanna Iikkanen

KAHDEN SPERMANPESU- MENETELMÄN VERTAILU

– Siittiöiden määrän ja morfologian vertailu



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Sanna Iikkanen

KAHDEN SPERMANPESUMENETELMÄN VERTAILU

Vuonna 2012 TYKS Naistentautien Fertilitiitilaboratoriossa oli yhteensä 3698 potilaskontaktia, joista 468 oli inseminaatio-, IVF- ja ICSI-hoitoja. Ennen hedelmöityshoitomuodon valitsemista tutkitaan sperman laatu sperma-analyysin avulla. Sperman laadun tärkeimpiä osoittimia ovat siittiöiden määrä miljoonina millilitrassa, liike sekä morfologinen määräyty, jossa katsotaan siittiöiden pään, keskikappaleen ja hännän epämuodostuneisuutta. Morfologialla on todettu olevan yhteys sperman laatuun ja siittiöiden kykyyn hedelmöittää munasolu. Sperma-analyysin jälkeen, ennen jokaista hedelmöityshoitoa, spermanäyte pestään. Pesun tarkoituksena on erottaa parhaiten liikkuvat siittiöt siemenplasmasta ja kuolleista siittiöistä. Käytetyimpiä pesumenetelmiä ovat gradienttisentrifugointi- ja swim-up- pesumenetelmä. Gradientti-sentrifugointimenetelmässä liikkuvat siittiöt sentrifugoidaan näyteputken pohjaan tiheyksiltään erilaisten liuosten läpi. Swim-up- menetelmässä liikkuvat siittiöt uivat näyteputken pohjalta viljelynestekerrokseen. Kumpaakin menetelmää käytetään. Näistä menetelmistä gradienttipesu on helpommin standardoitavissa ja sitä käytetään, kun halutaan määrällisesti paljon siittiöitä.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla swim-up- ja gradienttisentrifugointimenetelmän avulla saatavien spermanäytteiden eroavaisuutta. Menetelmien vertailuun käytettiin Turun Yliopistollisen Keskussairaalan IVF-laboratorion asiakasnäytteitä. Asiakasnäytteitä oli 23 ja jokaiselle näytteelle tehtiin sperma-analyysi, morfologinen määräyty ja näyte pestiin kahdella eri pesumenetelmällä.

Tämän opinnäytetyön tuloksena gradienttisentrifugointimenetelmällä saatiin määrällisesti enemmän siittiöitä kuin swim-up -menetelmällä. Siittiöiden eteenpäin suuntautuva liike oli myös parempaa gradienttimenetelmällä pestyissä näytteissä. Morfologia-analyysin perusteella, kumpikin menetelmä antoi samankaltaisia tuloksia, joten niiden perusteella ei voida sanoa, kumpi menetelmä olisi parempi erottelemaan morfologialtaan poikkeavia siittiöitä.

ASIASANAT:

sperma, sperma-analyysi, gradienttisentrifugointi, swim-up -menetelmä

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical laboratory scientist Degree programme | Cell- and molecularbiology

Autumn 2014 | 28+5

Thesis supervisor: Sanna Virtanen

Sanna Iikkanen

COMPAIRING TWO SPERM WASHING METHODS

In 2012, the Turku University Hospital of Women's disease Fertility laboratory had a total of 3698 patient contacts from which 468 were insemination, IVF and ICSI treatments. Before selecting infertility treatment method the quality of sperm is studied in semen analysis. Most important indicators of the sperm quality are the sperm quantity in millions per milliliter, motility and morphology characteristics of spermatozoa; where the sperm head, mid-piece and tail abnormalities are studied. Morphology has been linked to sperm quality and to the sperms ability to fertilize an oocyte. After the semen analysis but before each fertilization treatment, sperm is washed. The purpose of washing is to separate the most motility spermatozoa from semen plasma and other debris. There are two main techniques to separate viable motile sperm: gradient centrifugation and swim-up-washing method. In gradient centrifugation method, the motility sperm is centrifuged to the bottom of the sample tube by using different densities of solutions. In swim-up method, the motility spermatozoon swims from the basis of the sample tube to the layer of culture medium. Both methods are being used. Between these methods, the gradient is easier to standardize and it's used when lots of spermatozoa is wanted.

The purpose of this thesis was to compare swim-up and gradient centrifugation methods and the differences between the obtained results. Customer samples from Turku University Central Hospital IVF laboratory were used for the comparison. 23 customer samples went through semen analysis, morphology assessment and the samples were washed using both methods.

As a result of this thesis, gradient centrifugation method gave more spermatozoa than the swim-up method. Also the sperms forward motion was better when gradient method was used. Based on morphology, conclusions can't not be made on which method would be a better choice since the results are quite equal.

KEYWORDS:

Sperm, semen analysis, sperm preparation, gradient centrifugation, swim-up method

SISÄLLYSLUETTELO

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)	6
1 JOHDANTO	7
2 TEOREETTINEN TAUSTA	8
2.1 Spermanäytteen makroskooppinen tutkiminen	8
2.2 Spermanäytteen mikroskooppinen tutkiminen	8
2.3 Swim-up -pesumenetelmä	11
2.4 Gradienttisentrifugointimenetelmä	12
2.5 Hedelmöityshoitomuodot	13
2.6 Aikaisemmat tutkimukset	13
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE	15
4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	16
4.1 Opinnäytetyön toteutus	16
4.2 Metodologiset lähtökohdat	17
4.3 Eettiset lähtökohdat	18
5 TUTKIMUSTULOKSET	19
6 POHDINTA	23
6.1 Tulokset	23
6.2 Virhelähteet	26
6.3 Luotettavuus	26
6.4 Jatkotutkimukset	27
LÄHTEET	28

LIITTEET

Liite 1. Opinnäytetyön toimeksiantosopimus

Liite 2. TYKS Naistenklinikan Hoitosuostumus-lomake

Liite 3. Työohjeet

KUVAT

Kuva 1 Siittiön rakennepoikkeavuuksia (WHO 2010)	10
Kuva 2 Swim-up- menetelmän havainto (Sanna Iikkanen, 2014)	11
Kuva 3 Gradienttisentrifugointimenetelmän havainto (Sanna Iikkanen, 2014)	12

KUVIOT

Kuvio 1 Keskiarvo siittiöiden määrästä miljoonina millilitrassa	19
Kuvio 2 Keskiarvo siittiöiden liikkeestä	20
Kuvio 3 Eteenpäin liikkuvien siittiöiden määrä prosentteina	20
Kuvio 4 Morfologian vaikutus siittiösaaliiseen eri pesumenetelmillä	21
Kuvio 5 Pesumenetelmän vaikutus lopulliseen morfologiaan	22

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)

DNA-fragmentaatio	DNA:n pilkkoutuminen. DNA-rihmastoon tulee katkoksia. DNA:n lukeminen ja siitä johtuen myös solun toiminta häiriintyy. Siittiö voi hedelmöittää munasolun mutta se voi vaikuttaa hedelmöittyneeseen soluun ja siitä muodostuvan alkion kehitykseen.
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection. (suom. mikrohedelmöitys). Keinohedelmöityksen muoto, jossa munasolu hedelmöitetään injektoidulla yksittäisellä siittiöllä munasolun sisään.
In vitro	Koeputkessa
IUI	Intra Uterine Insemination. Inseminaatio, pestyjen siittiöiden ruiskuttaminen kohtuonteloon ohuella katetrilla.
IVF	In Vitro Fertilization, (suom. koeputkihedelmöitys). Keinohedelmöityksen muoto, jossa munasolut kerätään naisen kehosta ja hedelmöitetään siittiöillä laboratoriossa.
Papanicolau-värjäys	George Nicholas Papanicolaou'n kehittämä värjäysmenetelmä, joka perustuu hematoksyliini-eosiini -värjäykseen, jossa tuman ja sytoplasman kerrokset saadaan esille.
Siemenplasma	Sperman soluton osa.
Sperma-agglutinaatio	Siittiöiden tarttuminen yhteen. Siittiöt voivat tarttua toisiinsa pää-pää, häntä-häntä tai näiden yhdistelmänä.
Sperma-aggregaatio	Siittiöiden ryhmittäytyminen, kasautuminen, kokkaroituminen, takertuminen.
TZI-arvo	Teratozoospermiaindeksi on numeerinen ja se kertoo, kuinka monta epänormaalia osaa on keskimäärin epänormaalin muotoisessa siittiössä.

1 JOHDANTO

Spermanäyte pestään aina kun siittiöitä käytetään hedelmöitykseen (IVF eli *In vitro* fertilization tai ICSI eli Intracytoplasmic sperm injection) laboratoriossa. Pesun tarkoituksena on erottaa siemenplasma, epiteelisolut ja kuolleet siittiöt elävistä siittiöistä. Turun yliopistollisessa keskussairaalassa, naistenklinikan Fertiliteettilaboratoriossa (TYKS Fertiliteettilaboratorio), on tähän mennessä käytetty ns. swim-up -spermanpesumenetelmää.

Toisella yleisesti käytössä olevalla menetelmällä, gradienttisentrifugaatiolla, talteen otettavat siittiöt eristetään sentrifugoimalla ne ominaispainoltaan erilaisten liuoskerrosten läpi, minkä jälkeen putken pohjalle saostuneet siittiöt otetaan talteen ja suspentoidaan viljelynesteseen.

Swim-up -menetelmällä huonosti liikkuvat, normaalimuotoiset siittiöt, jäävät siemenplasmaan, kun taas gradienttipesu-menetelmällä myös huonosti liikkuvat siittiöt voidaan eristää. Näin ollen gradienttipesulla voidaan saada talteen siittiöitä, jotka ovat morfologialtaan hyviä, mutta joiden liikkuvuus on heikkoa.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kahden eri spermanpesumenetelmän testaaminen TYKS Naistenklinikan Fertiliteettilaboratoriossa. Työn tavoitteena oli kehittää TYKS Fertiliteettilaboratorion toimintaa testaamalla ja käyttöönottamalla jo käytössä olevan swim-up -pesumenetelmän rinnalle gradienttipesumenetelmä.

2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Spermanäytteen makroskooppinen tutkiminen

Spermanäytteen makroskooppisella tutkimisella tarkoitetaan tutkimuksia, jotka voidaan tehdä silmämääräisesti. Näitä ovat spermanäytteen värin määrittäminen, viskositeetin arvioiminen, tilavuuden mittaaminen mitta-asteikolla sekä näytteen pH:n määrittäminen. Näytteen makroskooppinen tutkiminen aloitetaan silmämääräisellä tarkastelulla, kun näytettä on seisotettu noin 15-60 minuuttia huoneenlämmössä ja se on täysin liuennut. (World Health Organization 2010).

Näytteen viskositeettia voidaan arvioida aspiroimalla näytettä kertakäyttöiseen pipettiin ja venyttämällä näytettä; jos näytepisaran venyvyys on yli kaksi senttimetriä, on näyte viskoosinen (WHO 2010). Normaali spermanäyte on väritykseltään opaali, vaalean harmahtava. Näytteestä määritetään tilavuus käyttämällä mitta-asteikkoputkea tai pipettiä. Näytteen tilavuus määritetään, jotta saadaan selville siittiöiden kokonaismäärä. Spermaasta määritetään pH indikaattoritestillä. Normaalin sperman pH on 7.0 - 8.0. Korkea pH-arvo saattaa viitata tulehdukseen eturauhasessa tai rakkularauhasessa (seminaalivesikkeli). Miehen ikääntyessä spermantuotanto kuitenkin vähenee ja pH-arvo nousee, eikä tämä liity tulehdukseen. Vastaavasti matala pH voi viitata rakkularauhasen kehityshäiriöön, joka aiheuttaa spermamäärän vähenemistä. Lisäksi tutkimuksessa kiinnitetään huomiota jos näytteessä on poikkeava haju, koska voimakas haju voi viitata tulehdukseen. (WHO 2010, TYKS Fertiliiteettilaboratorio.)

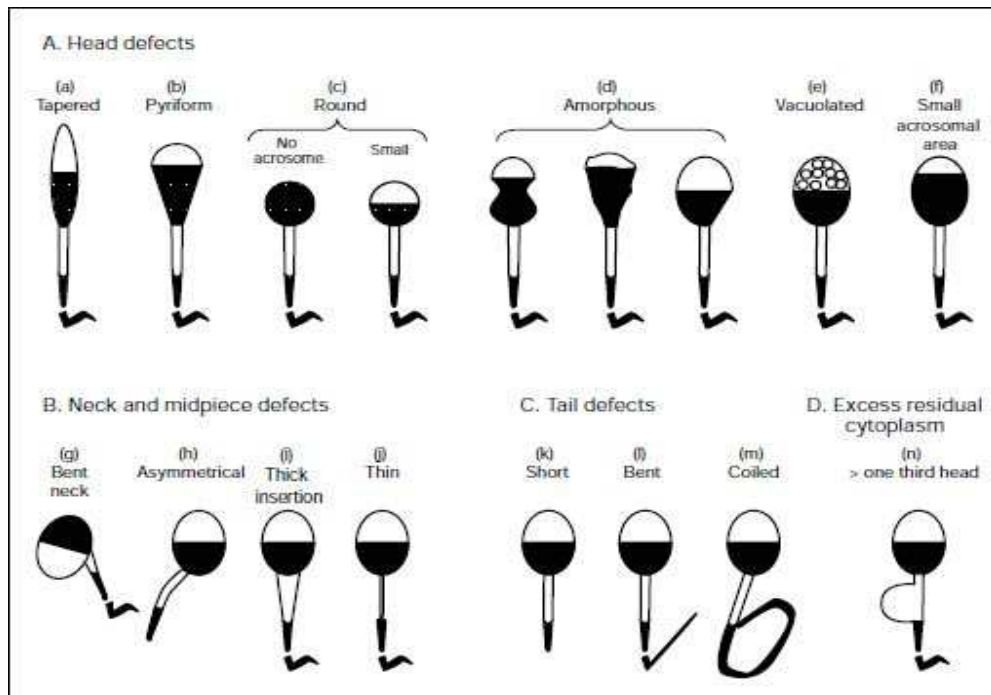
2.2 Sperman mikroskooppinen tutkiminen

Sperman mikroskooppisella tutkimisella määritetään siittiöiden tiheys, liikkuvuus, vasta-ainemääritys eli *MAR* –testi (mixed antiglobulin reaction) ja morfologinen arvio (WHO 2010). Spermanäytettä pidetään sekoittajassa ennen näytteen pipetoimista Makler-laskentakammioon. Laskentakammioon pipetoidaan kymmenen mikrolitraa spermaa ja solulaskurin avulla lasketaan siittiöt kymmenen ruudun alueelta (WHO 2010). Kolmen laskennan keskiarvo ilmaisee siittiöiden määrän

miljoonina millilitrassa. Mikroskooppisessa tarkastelussa huomioidaan myös agglutinaatio tai aggregaatio sekä pyöreiden solujen määrä. Näitä ovat yleensä erytro- ja leukosyytit sekä kivesperäiset epäkypsät siittiösolut. TYKS Fertiliti-laboratoriossa siittiöiden liikkuvuus arvioidaan WHO:n vuonna 1999 määrittämällä liikkuvuusluokituksella, jossa siittiön liike on jaettu neljään luokkaan A:sta D:n. A on nopeasti ja suoraan etenevät siittiöt, B kaarrellen eteenpäin liikkuvat, C paikallaan liikkuvat ja D liikkumattomat (WHO 1999). WHO:n 2010 julkaisemassa suosituksessa liikkuvuus jaetaan kolmeen luokkaan: 1) progressiivinen liike: siittiöt liikkuvat aktiivisesti, joko lineaarisesti tai suurpiirteistä ympyrää nopeudesta riippumatta, 2) non-progressiivinen liike: paikallaan liikkuvat siittiöt, uinti pienellä alueella, hännän liike vaimea ja 3) täysin liikkumattomat siittiöt (WHO 2010).

Vasta-ainetestin eli *MAR*- testi aloitetaan pipetoimalla latex- partikkeleita ja IgG-luokan vasta-aineita aluslasille, johon lopuksi pipetoidaan spermaa. Pisarat sekoitetaan yhteen ja peitetään peitinlasilla. (WHO 2010) Tämän jälkeen lasia tarkastellaan mikroskoopilla kolmen ja kymmenen minuutin kuluttua testin aloittamisesta. Lasilta lasketaan sadasta liikkuvasta siittiöstä latex- partikkeleihin tarrautuneiden siittiöiden määrä ja laskenta toistetaan kymmenen minuutin kuluttua. Jos laskettujen liikkuvien siittiöiden määrästä yli 50% on tarrautunut latex- partikkeleihin, on vasta-aine testin tulos positiivinen ja tällöin tulisi myös IgA- luokan vasta-aineet seuloa spermanäytteestä. IgA- testi tehdään yleensä myös silloin, jos näyte on voimakkaasti agglutinoiva. (WHO 2010)

Siittiöiden morfologisesta arviosta saadaan tietoa siitä, kuinka paljon näytteessä esiintyy prosentteina epänormaaleja siittiöitä, mikä saattaa vaikuttaa sperman hedelmöityskykyyn. Siittiöiden morfologista määrittämistä varten spermasta tehdään sivelyvalmiste objektilasille, mikä värjätään Papanicolaou värjäysmenetelmällä. Siittiön rakenne on jaettu pää-, keskivartalo- ja häntä-osaan, ja jokaisesta näistä lasketaan rakenteiden normaali tai epänormaali osa. Kuvassa 1 nähdään siittiön rakenteen erilaisia poikkeavuuksia, joihin kiinnitetään huomiota morfologisessa arviossa.



Kuva 1 Siittiön rakennepoikkeavuuksia (WHO 2010)

Normaalin siittiön pää on sulavalinjainen ja muodoltaan ovaalimainen. Siittiön pituus on 5 – 6µm, leveys 2,5 – 3,5µm ja hännän pituus pidempi kuin 45µm. (Lens 1996, WHO 2010)

Laskennan avulla määritetään myös teratozoospermiaindeksi:

$$TZI = \frac{\%(epänorm.pää) + \%(epänorm.keskikappale) + \%(epänorm.häntä)}{\%(epänorm.siittiöitä)}$$

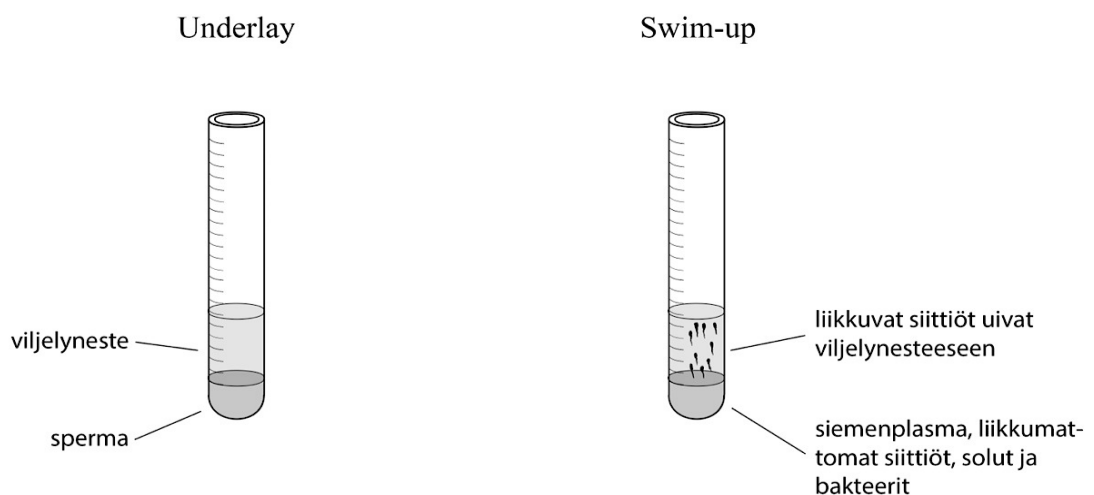
Indeksi kertoo, montako epänormaalia osaa on keskimäärin epänormaalin muotoisessa siittiössä. WHO:n morfologisen määritelmän mukaan, mikäli rakenteeltaan normaalien siittiöiden määrä on alle kuin 50 % luokitellaan morfologia epänormaaliksi. (Lens 1996, WHO 2010)

2.3 Swim-up –pesumenetelmä

Swim-up -menetelmässä koeputkeen pipetoidaan ensin spermaa ja tämän päälle viljelynestettä. Tätä vaihetta kutsutaan underlay-vaiheeksi (Kuva 2.). Swim-up -pesumenetelmä perustuu liikkuvien siittiöiden kykyyn uida siemenplasmasta pesuliuokseen. Huonosti liikkuvat ja kuolleet siittiöt jäävät siemenplasmaan. Viljelynestekerros otetaan talteen ja siinä olevat siittiöt sentrifugoidaan vielä koeputken pohjaan ja annetaan uida päälle lisättävään viljelynesteeseen. Yläkerros otetaan jälleen talteen, minkä jälkeen määritetään siittiötiheys ja tehdään sopiva käyttölaimennos, yleensä noin neljä miljoonaa siittiötä/millilitra viljelynestettä.

Sperman pesu tulisi aloittaa tunnin sisällä näytteen antamisesta, koska halutaan välttää mahdollisten muiden solujen ja bakteerien vaikutus siittiöihin (WHO 2010). Siittiöiden määrä lopullisessa liuoksessa on yleensä pienempi kuin gradienttipesumenetelmän jälkeen. Menetelmän etuna on sen kyky erottaa hyvin liikkuvat siittiöt spermasta, näin kuolleiden tai paikallaan olevien siittiöiden määrä lopputuotteessa on pieni. (WHO 2010, TYKS Fertiliteettilaboratorio 2007)

Swim-up -menetelmä

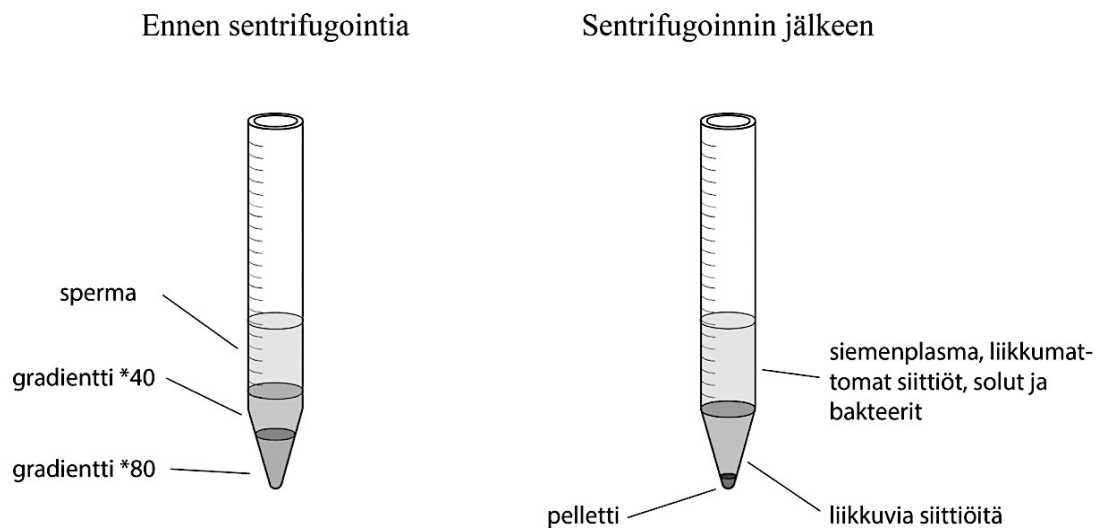


Kuva 2. Swim-up -pesumenetelmän periaate (© likkanen Sanna, 2014).

2.4 Gradienttisentrifugointimenetelmä

Gradienttipesu erottaa siittiöt, siemenplasman pyöreistä soluista ja muusta materiaalista. Se on helpompi standardoida kuin swim-up-pesumenetelmä, joten myös tulokset ovat tasaisempia. Tätä pesumenetelmää käytetään kun halutaan mahdollisimman paljon siittiötä IVF- ja ICSI-hoitoja varten. (WHO 2010.) Gradienttipesu tehdään kolloidista piitä sisältävästä liuoksesta liuosta laimentamalla eri vahvuisiksi laimennoksiksi. Näin niille saadaan erilaiset tiheydet. Näistä tiheyksiltään erilaisista liuoksista valmistetaan pipetoimalla kaksikerroksinen gradientti, jonka päälle pipetoidaan spermaa. Sentrifugointi erottaa siittiöt siemenplasmasta niiden ominaispainon avulla. (Kuva 2.). Liikkuvat siittiöt ovat putken pohjalla ja kuolleet siittiöt sekä muut solut ovat putken ylemmässä osassa. (Lens 1996, WHO 2010).

Gradienttisentrifugointi



Kuva 3. Gradienttisentrifugointimenetelmän periaate (© likkanen Sanna, 2014).

2.5 Hedelmöityshoitomuodot

TYKSiin Naistenklinikalla hedelmöityshoitomuodon valitsemiseen ei ole tarkkoja viitearvoja, vaan jokaiselle parille valitaan yksilöllinen hoitomuoto. Hoitomuodon valitsemiseen vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa ikä, aiemmat hoidot ja niiden menestys, aiemmat lapset, sperman viskositeetti, siittiöiden määrä, liike, morfologia ja vasta-aineet.

Inseminaatio on toimenpide, jossa sperman pesussa erotellut, hyvin liikkuvat, siittiöt ruiskutetaan kohtuonteloon munasolun irtoamisen aikaan. (Väestöliitto, 2014.)

IVF eli koeputkihedelmöitys on menetelmä jossa munasolut hedelmöitetään pesu-tyillä siittiöillä. IVF-hoitomuoto on yleisin lapsettomuuden hoitomuoto. IVF-hoi-toon tulevilla miespotilailla siittiöiden määrä on vähäinen ja laatu on heikentynyt. Koeputkihoitoa voidaan käyttää lähes kaikissa lapsettomuuden ongelmassa, oli kyse naisen tai miehen hedelmättömyyshäiriöistä. (Väestöliitto, 2014.)

ICSI- eli mikrohedelmöitysmenetelmää käytetään, kun sperman laatu on huono ja suurin osa siittiöiden liikkeestä on heikkoa. Yleisesti voidaan todeta, että mik-rohedelmöitykseen päädytään, jos siittiöiden määrä on alle kolme miljoonaa mil-lilitrassa. Hedelmöittääkseen munasolun siittiöllä täytyy olla kyky tarttua munaso-lun pintaan. Mikrohedelmöityksessä siittiö tehdään liikkumattomaksi injek-tioneulan avulla, minkä jälkeen munasolu hedelmöitetään viemällä yksittäinen siittiö injeksiolla munasolun sisään. (TYKS Fertilitteetilaboratorio.)

2.6 Aikaisemmat tutkimukset

Useimmat spermanpesumenetelmät on kehitetty erottamaan liikkuvat siittiöt muusta sperma-aineksesta, mutta myös sperman morfologinen arvio on ollut tär-keä kriteeri diagnosoitaessa miehen hedelmällisyyttä (Monqaut ym 2011). Mon-qautin ym. tutkimukseen osallistui 53 miestä, jotka kumppaninsa kanssa olivat lapsettomuushoidoissa lokakuun 2008 ja maaliskuun 2009 välisenä aikana. Spermanäytteet pestiin swim-up- ja gradienttimenetelmillä, ja niistä tutkittiin siitti-

öiden vakuolisoitumista sekä DNA:n pilkkoutumista eli DNA-fragmentaatiota. Alkutilanteeseen verrattaessa gradienttipesulla pestyt spermanäytteet sisälsivät enemmän siittiöitä kuin swim-up -menetelmällä pestyt näytteet. Liikkuvien siittiöiden määrä oli kuitenkin suhteellisesti suurempi swim-up -menetelmällä pestyissä näytteissä. (Monqaut ym 2011.)

Riccin ym. (2009) tutkimuksessa vertailtiin kuolleiden siittiöiden määrää virtaus-sytometrillä 62 gradientti- ja swim-up- menetelmällä pestystä näytteestä. Tutkimukseen osallistui 62 miestä, jotka olivat kumppaninsa kanssa lapsettomuustutkimuksissa. Näytteet analysointiin mikroskoopilla ja virtaussytometrillä ennen ja jälkeen spermanäytteen pesun. (Ricci ym 2009.) Tulokset osoittivat, että kummankin pesumenetelmän jälkeen kuolleiden siittiöiden määrä näytteessä oli vähentynyt radikaalisti. Elävien siittiöiden suhteellinen määrä (%-osuus) oli korkeampi swim-up- menetelmällä kuin gradientti-menetelmällä pestyissä näytteissä. Tosin suoraan etenevien ja liikkuvien siittiöiden konsentraatio oli suurempi gradientti- kuin swim-up- pesumenetelmän jälkeen. (Ricci ym 2009.)

Amirin ym. (2012) tutkimuksessa oli mukana 35 spermanäytettä, jotka käsiteltiin swim-up - ja gradienttipesumenetelmillä. Pestyistä näytteistä arvioitiin siittiöiden määrää, liikkuvuutta ja normaalia morfologiaa. Lisäksi kaikille näytteille suoritettiin DNA-fragmentaatiomääritys. (Amiri ym 2012.) Swim-up -menetelmällä pestyissä näytteissä oli radikaalisti enemmän DNA-fragmentaatiota kuin gradientti-menetelmällä pestyissä näytteissä. Gradienttipesumenetelmällä pestyissä näytteissä oli myös enemmän liikkuvia siittiöitä ja näyte sisälsi enemmän morfologialtaan normaaleja siittiöitä. (Amiri ym 2012.)

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Tässä opinnäytetyössä vertailtiin kahden eri spermanpesumenetelmän avulla saatavien tuloksien eroavaisuutta 23:ta näytteestä. TYKSin naistenlinikalla Fertiliiteetilaboratoriossa (TYKS Fertiliiteetilaboratoriossa). Tarkoituksena oli saada tietoa siitä, onko jommallakummalla pesumenetelmällä saatava pesutulos siittömäärältään tai morfologialtaan parempi. Opinnäytetyössä asiakkaan näyte jaettiin kahteen osaan ja näytteestä tehtiin gradienttisentrifugointi- sekä swim-up -pesu. Tämän jälkeen pestyistä näytteistä tehtiin siittiöiden morfologista tutkimusta varten mikroskooppipreparaatit, joista tehtiin sokkotestinä morfologinen arvio.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa tietoa gradienttisentrifugointipesumenetelmästä, jotta se voitaisiin ottaa käyttöön TYKS Fertiliiteetilaboratoriossa swim-up-pesumenetelmän rinnalle.

4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

4.1 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyön aihe tuli Turun yliopistollisen keskussairaalan naistentautien poliklinikalla toimivasta Fertilitteetilaboratoriosta toukokuussa 2013. Kesällä 2013 kerättiin opinnäytetyötä varten kirjallista materiaalia ja syksyllä kirjoitettiin tutkimussuunnitelma. Tutkimussuunnitelma hyväksyttiin lokakuun alussa ja samalla kirjoitettiin toimeksiantosopimus. Tutkimuksen *in vitro* -kokeet eli käytännön laboratoriotyö suoritettiin Fertilitteetilaboratorion tiloissa ja laboratorion omilla välineillä.

Syksyllä 2013 aloitettiin pesumenetelmien testaaminen. Testattiin gradienttipesumenetelmän sentrifugointiaikoja gradienttiliuoksella sekä laboratorioon tilattua *Thermo Scientific*-sentrifuugia. Tutkimuksen lopulliset työohjeet ovat liitteessä 3. Työohjeet tehtiin Nidacon:n suositusten mukaisesti. Varsinainen opinnäytetyön aineisto koostui laboratorion asiakkaiden antamista 23:ta sperma-analyysinäytteestä marras - tammikuun aikana 2013- 2014. Opinnäytetyön kirjoittaminen aloitettiin keväällä 2014.

Fertilitteetilaboratorion henkilökunta pyysi asiakkailta kirjallisella suostumuksella lupaa sperma-analyysinäytteiden jatkokäyttöön opinnäytetyötä varten (Liite 2). Empiirisen jakson aikana pestiin lapsettomuushoitoihin tulevien asiakkaiden sperma-analyysinäytteet kahdella eri spermanpesumenetelmällä. Näistä näytteistä tehtiin pesujen jälkeen morfologiset lasit ja morfologinen arvio.

Numeroiduista näytteistä tehtiin sperma-analyysi, josta määritettiin näytteen kokonaistilavuus, pH, agglutinaatio ja mikroskoopilla laskettiin manuaalisesti siittiöiden määrä ja liikkuvuus Maklerin kammiossa. Tämän jälkeen näyte jaettiin kahteen osaan ja pestiin swim-up - ja gradienttisentrifugointimenetelmällä. Pesujen jälkeen näytteistä laskettiin uudestaan siittiöiden määrä ja liikkuvuus.

Henkilökunta valmisti morfologiset näytelasit, jossa pesty näyte vedettiin lasille ja ilmakeivattiin. Tämän jälkeen näytelasi upotettiin 80 %:n etanoliin vuorokaudeksi.

Henkilökunta merkitsi lasit, niin ettei opinnäytetyöntekijä tiennyt, kummassa lassa on gradienttisentrifugointi- tai swim-up- menetelmällä pesty näyte. Seuraavana aamuna lasit menivät Papanicolau-värjäykseen. Värjäyksen teki TYKS – SAPA liikelaitoksen patologian osasto 939. Värjäyksen jälkeen laseista tehtiin morfologinen arvio, jossa laskettiin siittiöiden pää, keskivartalo ja hännän normaalit ja epänormaalit osat. Laskennan jälkeen määritettiin TZI-arvo (kts. sperman mikroskooppinen tutkiminen).

Kaikille näytteille tehtiin swim-up- ja gradienttisentrifugointipesu, ja lisäksi kahdella pesumenetelmällä pestyistä näytteistä tehtiin omat morfologiset lasit. Kaikki analyysin tiedot sekä morfologisesta arviosta saadut tulokset kirjattiin Excel-ohjelmaan seuraavasti: näytenumero, päivämäärä, kellonaika jolloin analyysi alkoi, näytteen kokonaistilavuus, pH, mahdollinen agglutinaatio, siittiöiden määrä ja liikkuvuus. Lisäksi morfologisessa arviossa laskettiin pää, keskikappale, häntä ja TZI- arvo.

4.2 Metodologiset lähtökohdat

Tämä opinnäytetyö oli kvantitatiivinen tutkimus eli määrällinen tutkimus. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa tarkastellaan ja mitataan eri muuttujia ja niiden välistä vuorovaikutusta. Tämä vaatii ilmiön tekijöiden, parametrien tai muuttujien tuntemista. (Kananen 2011.) Kvantitatiivisessa tutkimuksessa ilmiön tekijät muutetaan muuttujiksi, joita voidaan käsitellä määrällisessä tutkimuksessa tilastollisin menetelmin esimerkiksi numeroina ja taulukoina (Kananen 2011). Sama asia mainitaan eettisessä osassa, toistoa ei tarvita

Kvantitatiiviselle tutkimukselle tyypillistä on otannan suunnittelu, joka koostuu tutkimusmenetelmän valinnasta, aineiston keräämistavasta ja lopullisesta otoksesta, joka vastaa kattavasti tutkimusongelmaan (Vilkkä 2006). Opinnäytetyön otoskooksi tuli 23, jonka perusteella voidaan vastata riittävästi tutkimustavoitteeseen.

Tämä tutkimus oli luonteeltaan deduktiivinen eli teorian pohjalta tehtiin työn empiirinen osuus, jossa spermanäytteet pestiin kahdella eri pesumenetelmällä. Tutkimustulokset laitettiin numeeriseen muotoon, mikä on tyypillistä kvantitatiiviselle tutkimukselle.

4.3 Eettiset lähtökohdat

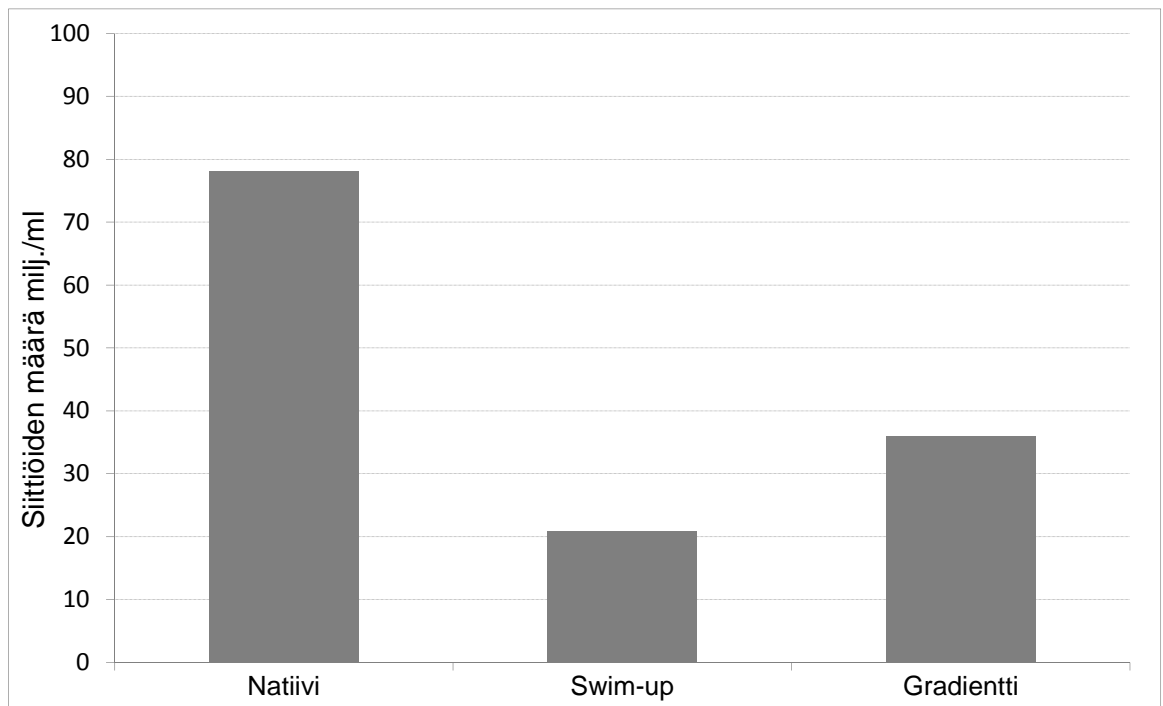
Tutkimusta tehdessä on pyrittävä olemaan kriittinen sekä lähteiden valinnassa, että niitä tutkittaessa. Lähteestä tulee tarkastaa muun muassa sen ikä ja alkuperä sekä ottaa huomioon lähteen puolueellisuus. Mitä tarkempaa lähteiden käyttö ja merkitseminen on, sen paremmin tutkimus pohjaa hyvää tieteellistä käytäntöä. (Vilkkä 2005.) Tätä opinnäytetyötä tehdessä pyrittiin käyttämään mahdollisimman tuoreita ja luotettavia lähteitä.

Opinnäytetyötä varten tehtiin kirjallinen toimeksiantosopimus TYKS naistenklinikan IVF-laboratorion ja opinnäytetyöntekijän välillä (Liite 1). Opinnäytetyössä käytetyt potilasnäytteet olivat IVF-laboratorion asiakkaiden sperma-analyysinäytteitä. Laboratorion henkilökunta kysyi kaikkiin näytteisiin asiakkailta kirjallisen luvan (Liite 2). Tutkimukseen osallistuvilla henkilöillä oli oikeus päättää, osallistuivatko he tutkimukseen vai eivät. (Hirsjärvi ym. 2009.) Henkilökunta poisti näyteastioista potilastiedot ja numeroi näytteet. Opinnäytetyöntekijä ei näin ollen ollut tekemisissä potilastietojen tai potilastietokantojen kanssa opinnäytetyöprosessin aikana.

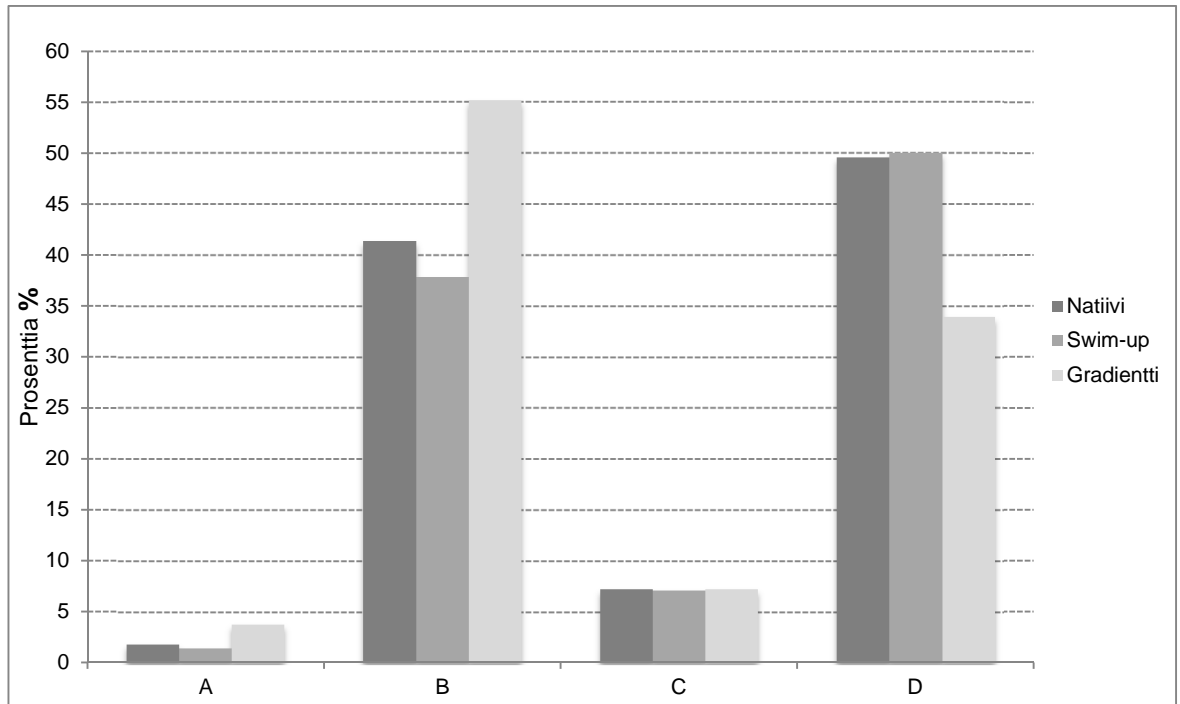
Opinnäytetyössä noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä. Aineiston keräämisessä ja analysoinnissa, tulosten kirjaamisessa ja arvioinnissa sekä koko prosessin aikana noudatettiin rehellisyyttä, huolellisuutta, tarkkuutta ja tunnollisuutta. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.) Analyysitulokset kirjattiin totuudenmukaisesti ja vääristelemättä. Kaikki työohjeet säilytettiin. Plagiointia vältettiin ja käytetyt lähteet merkittiin asianmukaisesti tekstiin ja lähdeluetteloon. Tutkimustuloksia tai aineistoa ei tulisi väärentää, eikä tutkija saa osallistua vilppiin, toimia puolueellisesti tai vääristellä tietoa (Clarkeburn & Mustajoki 2007, Kuula 2011).

5 TUTKIMUSTULOKSET

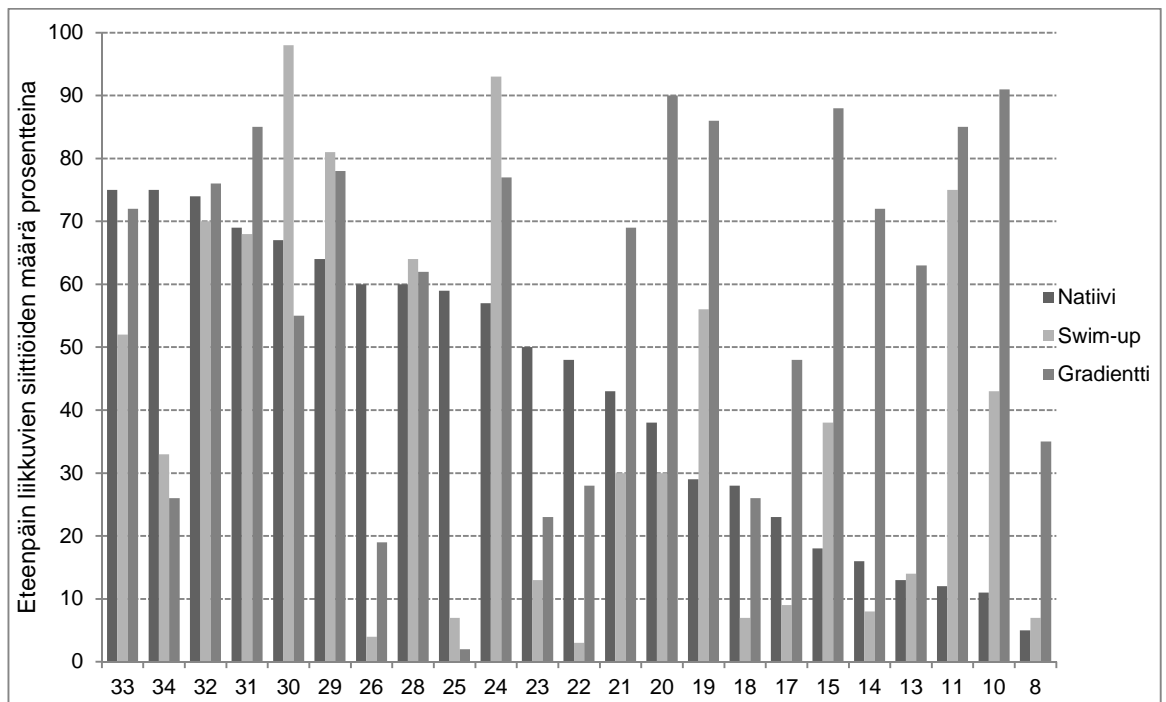
Tutkimukseen otettiin 23:n lapsettomuushoitoihin tulevan asiakkaan sperma-analyysinäytettä. Opinnäytetyöhön osallistuneiden asiakkaiden ikäjakauma oli 21- 40- vuotta ja keski-ikä 32 vuotta. Tutkimukseen valittujen näytteiden sperman laadun keskiarvo tiheydelle oli noin 78 miljoonaa millilitrassa ennen pesua. Liikkuvuuden keskiarvo oli: A-liikettä noin 2 %, B-liikettä noin 41 %, C-liikettä noin 7 % ja D-liikettä noin 50 %. Opinnäytetyössä vertailtiin ennen spermanpesuja tehtyä sperma-analyysia eli natiivinäytettä ja swim-up- ja gradienttisentrifugointi-menetelmien jälkeiseen siittiömäärään, liikkeeseen ja morfologiaan.



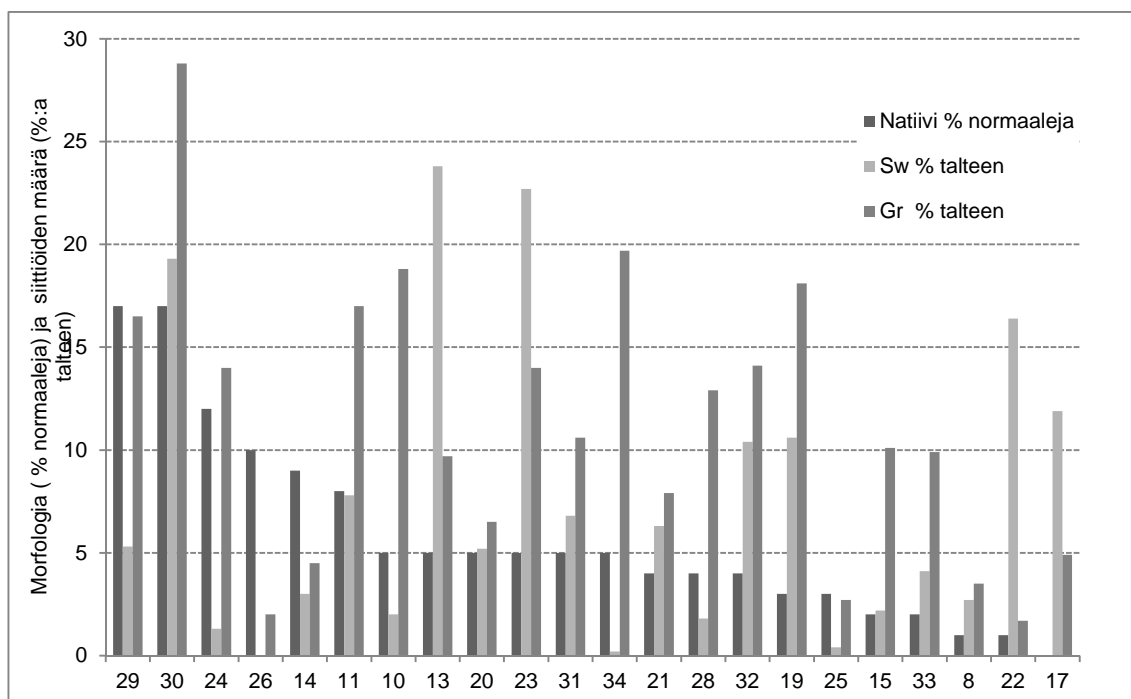
Kuvio 1. Keskiarvo siittiöiden määrästä miljoonina millilitrassa.



Kuvio 2. Keskiarvo siittiöiden liikkeestä A - D:n, jossa natiivi on ennen pesumenetelmiä saatu siittiöiden liike.

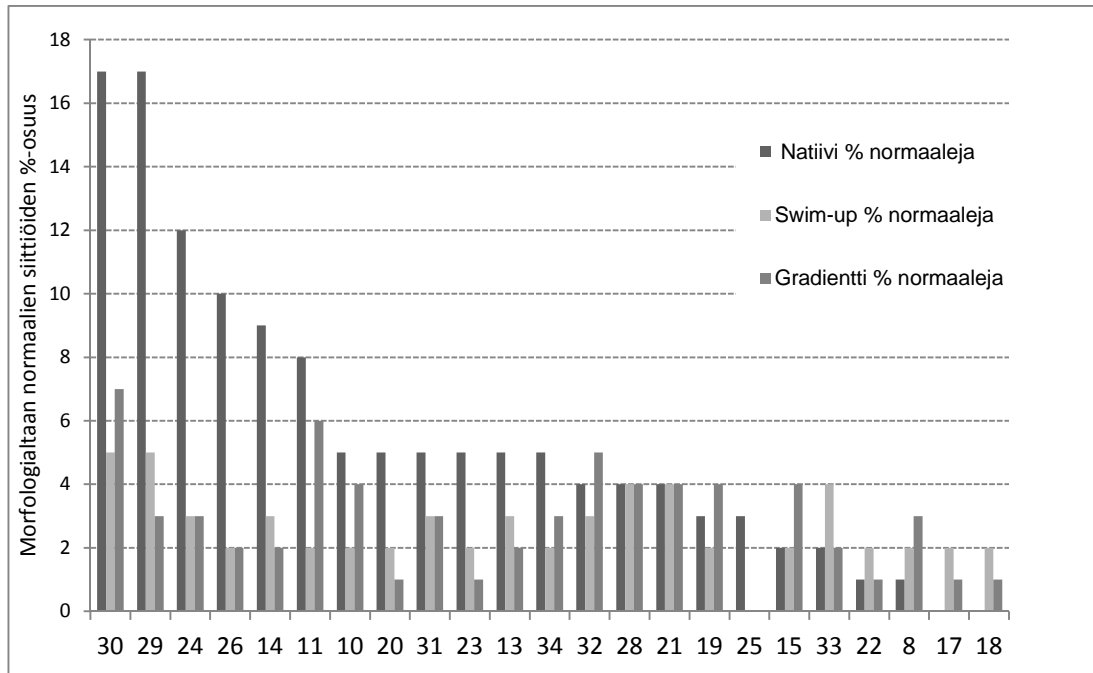


Kuvio 3. Eteenpäin liikkuvien siittiöiden A+B osuus jokaisesta näytteestä.



Kuvio 4. Morfologian vaikutus siittiöidenmäärään eri pesumenetelmillä.

Morfologialtaan normaalit siittiöt järjestettiin ennen pesua (natiivi) analysoidun morfologian mukaan, jossa ensimmäisenä oli eniten normaaleja siittiöitä sisältänyt näyte. Tässä kuvassa on verrattu natiivinäytteistä saatua normaali muotoisten siittiöiden prosenttiosuutta, pesumenetelmien jälkeen saatuun siittiöiden määrää prosentteina.



Kuvio 5. Siittiömorphologia eri pesumenetelmien jälkeen.

Kuvion näytteet on järjestetty eniten morfologialtaan normaaleja siittiöitä omaavan natiivinäytteen mukaan.

6 POHDINTA

6.1 Tulokset

Kuviossa 1 on ennen pesuja sekä swim-up ja gradienttipesujen jälkeen saatu tiheys laskettuna keskiarvoksi, miljoonaa millilitrassa, kaikista 23:ta näytteestä. Natiivinäytteessä eli ennen pesua tehdyssä arviossa on eniten siittiöitä. Natiivinäytteen keskiarvoon verrattiin swim-up- ja gradienttipesumenetelmällä saatuja tiheyden keskiarvoja. Swim-up- menetelmällä on saaliiksi saatu tavallisesti noin kaksikymmentä miljoonaa siittiötä millilitrassa, kun gradienttimenetelmällä voidaan saada talteen enemmän siittiöitä. Keskiarvoja vertaamalla ei kuitenkaan voida sanoa, että gradienttisentrifugointimenetelmä olisi tässä tutkimuksella ollut parempi menetelmä kuin swim-up- menetelmä. Pestyjen näytteiden määrä oli suppea ja näytteiden tiheys vaihteli voimakkaasti.

Kuviossa 2 siittiöiden liikettä A - D arvioitiin keskiarvojen avulla. Diagrammista voidaan todeta, että tutkimukseen saatujen näytteiden eteenpäin liikkuvien siittiöiden määrä oli vähäinen. Verrattuna swim-up- menetelmään gradienttisentrifugointimenetelmällä saatiin lopulliseen näytteeseen enemmän A + B-liikettä. Yleensä sperman pesun jälkeen D-liikettä on vähän, joten yksittäisistä näytteistä koottu kuvio osoittaa spermanäytteiden heikon laadun. Virhelähteissä on pohdittu tarkemmin myös D-liikkeen määrää tässä tutkimuksessa.

Kuviossa 3 on esitetty A+B -liikkeen määrä prosentteina. Tulokset järjestettiin eniten eteenpäin liikkuvia siittiöitä sisältävästä näytteestä vähiten liikkuvia siittiöitä sisältävään näytteeseen. Diagrammista nähdään, että gradienttimenetelmällä pestyissä näytteissä siittiöt olivat paremmin liikkuvia ja eteenpäin liikkuvia siittiöitä oli määrällisesti enemmän kuin swim-up- menetelmällä pestyissä näytteissä.

Kuviossa 4 natiivinäytteet on järjestetty eniten rakenteeltaan normaaleja siittiöitä sisältävästä näytteestä vähiten normaaleja siittiöitä sisältävään näytteeseen. Tar-

koituksena oli nähdä, saadaanko jommallakummalla pesumenetelmällä prosentuaalisesti vähemmän siittiötä talteen, kun morfologia huononee. Kuviosta nähdään, että swim-up- ja gradienttimenetelmällä saatiin hyvin tasaväkisiä tuloksia verrattaessa morfologiaan. Kuviosta 4 on poistettu näyte numero 18, koska näytteessä swim-up- menetelmällä on saatu huima piikki, vaikka natiivi morfologiassa ei esiintynyt yhtään normaalia siittiötä, ja swim-up- menetelmän jälkeen näytteestä yli puolet siittiöistä oli paikallaan olevia. Tämä osoittaa, että näytteessä oli siittiötä, mutta ne eivät olleet välttämättä lähtöisin viljelynestestä vaan esimerkiksi pelletistä. Jos näyte numero 18 olisi pidetty diagrammissa, se olisi vääristänyt muiden näytteiden vertailua toisiinsa.

Kuviossa 5 on verrattu natiivinäytteen sekä swim-up- ja gradientti-pesuista saattujen näytteiden normaalimuotoisten siittiöiden % - osuuksia. Näytteet järjestettiin natiivin morfologian mukaan parhaimmasta huonompaan. Morfologitutkimuksesta on todettu aikaisemmin olevan eniten hyötyä ICSI-hoidoissa, jossa mikroskoopissa etsitään parhain siittiö munasolun hedelmöitykseen. Pylväitä tarkasteltaessa nähdään, että pesumenetelmästä riippumatta tulokset olivat tasavertaisia. Ei siis voida sanoa kumpi menetelmistä olisi selkeästi parempi tuloksien tasavertaisuudesta johtuen.

Lopputuloksena gradienttisentrifugointimenetelmällä saatiin tässä tutkimuksessa parempi tiheys ja eteenpäin liikkuvien siittiöiden määrä, joka viittaa, että gradienttimenetelmää voisi käyttää inseminaatioissa ja IVF- hoidoissa. Morfologisen arvion perusteella ei voida sanoa, kumpi menetelmistä olisi parempi esimerkiksi ICSI- hoitoja varten, joissa morfologialla on merkitystä.

Tätä opinnäytetyötä varten oli haastavaa löytää lähdemateriaalia. Painettua ja luotettavaa kirjallisuutta niin suomeksi kuin englanniksikin oli rajoitetusti saatavilla. WHO:n laboratoriomanuaali onkin näytellyt suurta osaa tämän opinnäytetyön tekstissä ja monet eksaktit arvot on otettu manuaalista. Useat yritykset ja laboratoriot kertovat yleisesti lapsettomuushoitomenetelmistä internetissä, kuitenkin kaikille näille tiedoille ei ole tarkkaa lähdettä ja näin myös teksti saattaa sisältää tietoa, joka ei ole uusinta tai tarkistettua. Aikaisempia vertailututkimuksia on olemassa, mutta niiden tutkimusote ei ole ollut täysin samantyyppinen kuin

tässä opinnäytetyössä. Opinnäytetyössä käytetyt aikaisemmat tutkimukset ovat myös vertailleet muita asioita kuin pesumenetelmiä. Tutkimuksissa on esiintynyt voimakkaasti tutkijoiden mielipide siitä, kumpi menetelmä on parempi, lisäksi menetelmissä ei ole käytetty täysin samoja analyysiprosesseja kuin tässä opinnäytetyössä. Monqautin ym. 2011 tutkimuksessa gradientti-menetelmällä oli saatu suurempi siittiötiheys kuin swim-up -menetelmällä ja swim-up -menetelmällä vastaavasti taas parempi liike. Tämä tutkimuksen tulokset poikkesivat swim-up -menetelmän osalta Monqautin ym. tuloksista.

Riccin ym. 2009 tutkimuksessa oli huomattu kuolleiden siittiöiden vähentyneen pesumenetelmien jälkeen ja swim-up -menetelmällä oli saatu suurempi tiheys. Gradientilla oli kuitenkin saatu parempi liike kuin swim-up -menetelmällä. Riccin tutkimuksessa gradienttipesulla oli myös saatu parempi liike ja tiheys kuin swim-upilla. Amirin ym. 2012 tutkimuksessa gradientti menetelmällä oli saatu parempi tiheys, liike ja morfologia. Amirin tutkimuksen morfologisessa vertailussa tulokset olivat hyvinkin tasavertaiset, joten tämän perusteella ei voida sanoa gradientista saatua morfologiaa paremmaksi kuin swim-upista.

Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla kahta eri spermanpesumenetelmää sekä niistä saatavien tuloksien eroavaisuutta ja mahdollisesti osoittaa, että toisella menetelmällä saadaan parempi siittiömäärä, liike tai morfologia. Tässä tutkimuksessa gradienttimenetelmällä saatiin enemmän siittiöitä ja niiden liike oli parempi. Morfologiatutkimuksista saadut tulokset olivat niin vaihtelevia, että niiden perusteella ei voida sanoa, kumpi menetelmä tuottaa morfologialtaan paremman siittönäytteen.

Tavoitteena oli saada tietoa gradienttisentrifugointimenetelmästä, jotta se voitaisiin ottaa käyttöön TYKS Fertilitaetilaboratoriossa. Tämän opinnäytetyön työohjetta on käytetty Fertilitaetilaboratorion tekemissä hoitopesuissa ja sillä on saatu hyviä tuloksia inseminaatiohoidoissa.

6.2 Virhelähteet

Näytteet tulivat Turun yliopistollisen keskussairaalan naistenklinikan Fertilititeettilaboratorion lapsettomuushoitoihin tulevien parien miesten näytteistä. Laboratoriossa aamupäivä on yleensä kiireisintä aikaa, koska asiakkaat tulevat antamaan näytettä tai tuovat sen suoraan kotoaan laboratorioon. Tällöin myös kaikki mahdolliset välineet ja tilat ovat henkilökunnan käytössä. Opinnäytetyön käytännön työ tehtiin naistenklinikan laboratoriotiloissa ja sopivaksi työajaksi sovittiin vasta puolenpäivän jälkeen. Näytteenantoajankohtaan verrattuna näytteitä pääsi käsittelemään paljon myöhemmin.

Tutkimuksen tuloksissa on esiintynyt säännöllisesti kohtalaisen paljon paikallaan olevia siittiöitä, joka saattaa liittyä näytteen pitkään seisomisaikaan. Kuolleiden siittiöiden määrään vaikuttavat mahdollisesti myös monet muut tekijät, kuten näytteen voimakas viskositeetti, siittiöiden poikkeava rakenne ja näyteputken heilahtaminen tai törmääminen, joka mahdollistaa kuolleiden siittiöiden nousemisen pellettistä viljelynestekerrokseen. Nostatusliuosta siirrettäessä on mahdollista pipetoida liian läheltä pellettiä, jolloin lopulliseen otokseen tulee runsas määrä kuolleita siittiöitä. Potilaista johtuvia tekijöitä ovat vajaaksi jääneet näytteet: näytettä antaessa osa näytteen alku- tai loppuosasta on mennyt hukkaan, mikä vaikuttaa näytteen laatuun.

Mahdollisia virhelähteitä tarkasteltaessa otettiin huomioon, että kaikki testatut, validoidut liuokset ja sentrifugointiajat testasi ainoastaan työn suorittaja, jonka kokemus Fertilititeettilaboratoriotyöstä ei ole rutiininomainen. Pipetointivirheet, tiheys- ja tilavuuslaskentojen väliset runsaat vaihtelut voivat johtua työntekijän kokemattomuudesta.

6.3 Luotettavuus

Opinnäytetyössä noudatettiin Väestöliiton ja Nidaconin työohjetta, jonka pohjalta laadittiin käytetty työohje. Kaikki työssä käytetyt pesuliuokset olivat Nidaconin testaamia ja validoimia, ja työohjeen pohjalta työ on uudestaan toteutettavissa

laboratorio-olosuhteissa. Kaikki saadut tulokset kirjattiin vääristelemättä ja asianmukaisesti taulukoihin. Taulukoita muokattaessa tulokset tarkistettiin oikeiksi alkuperäisistä tiedostoista. Sokkotestinä tehdyt morfologiset lasit teki aina laboratorion henkilökunnan jäsen. Tulokset saatiin tietää vasta työn suorittamisen jälkeen; näin ei tapahtunut ennakoivaa tulkintaa pesutulosten perusteella.

6.4 Jatkotutkimukset


Tämän opinnäytetyön mahdollisia jatkotutkimusaiheita olisivat isommalla näyteotoksella ($n=50-100$) tehty samanlainen pesumenetelmien vertailututkimus. Tutkimukseen voisi rankata myös laadullisesti parhaat sperma-analyysinäytteet. Lisäksi olisi mahdollista kokeilla muiden valmistajien liuoksia ja vertailla niistä saatuja tuloksia toisiinsa. Liuoksilla voisi testata myös erilaisia määriä, esimerkiksi käyttämällä pienempiä määriä pesuliuosta näytemäärästä riippumatta.

LÄHTEET

- Amiri I.; Ghorbani M. & Heshmati S. 2012. Comparison of the DNA fragmentation and the sperm parameters after processing by the density gradient and swim up methods. Journal of clinical and diagnostic research Vol- 6(9): 1451- 1453.
- Clarkeburn H. & Mustajoki A. 2007. Tutkijan arkipäivän etiikka. Tampere: Vastapaino.
- Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uudistettu painos. Helsinki: Tammi.
- Kananen Jorma 2011. Kantti: kvantitatiivisen opinnäytetyön kirjoittamisen käytännön opas. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.
- Kuula Arja 2011. Tutkimusetiikka (Elektroninen aineisto): Aineistojen hankinta, käyttö ja säilytys. Painos 2 uudempi painos. Tampere: Vastapaino.
- Lens J.W. 1996. The Spermatozoon – practice. Teoksessa Bras, M; Lens, J.W; Piedriet, M.H; Rijnders, P.M; Verveld, M; Zeilmaker, G.H. (toim.) IVF Lab: Laboratory aspects of in-vitro fertilization. The Netherlands: N.V. Organon, 48-68.
- Monqaut A.; Zavaletta C.; López G.; Lafuente R. & Brassesco M. 2011. Use of high- magnification microscopy for the assesment of sperm recovered after two different sperm processing methods. American society for reproductive medicine. Fertility and Sterility Vol. 95, No. 1 277-280.
- MSD 2011. Hedelmöityshoidot- opas. Espoo MSD.
- Nidacon 2012. Puresperm 40/80 Product insert.
- Ricci G.; Perticarari S.; Boscola R.; Montico M.;Guaschino S. & Presani G. 2009. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. American society for reproductive medicine. Fertility and Sterility Vol. 91, No.2 632-638.
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012, Hyvä tieteellinen käytäntö. <http://www.tenk.fi/fi/htk-ohje/hyva-tieteellinen-kaytanto> Viitattu 6.2.2014
- TYKS Endokrinologian ja Lapsettomuuspoliklinikan toimintakertomus 2012.
- TYKS Fertilitteettilaboratorio 2007. Toimintaohje 434: Mikroinjektio (ICSI).
- TYKS Fertilitteettilaboratorio 2007. Toimintaohje 401: Sperma-analyysi.
- TYKS Naistenklinikka 2012. Hoitosuostumus 301a kaavake.
- Vilka Hanna 2005. Tutki ja kehitä. Kustannusosakeyhtiö Tammi. Otavan Kirjapaino Oy, Keuruu.
- Väestöliitto 2014. Lapsettomuushoidot (IUI ja IVF). Viitattu 3.12.2014 <http://www.vaestoliitto.fi/lapsettomuushoidot> > hedelmöityshoidot > Inseminaatio > Koeputkihedelmöitys.
- World Health Organization 2010, Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th. Edt. Geneve, Switzerland

Opinnäytetyön toimeksiantosopimus

1



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

OPISKELIJAN TIEDOT

Nimi Sanna Iikkanen

Osoite Loulavuorentie 50 C 21 20720 TURKU

Puhelin koti _____ Puhelin työ 044 333 1169

Sähköposti sanna.iikkanen@students.turkuamk.fi

Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma

OPINNÄYTETYÖ

Alue/ työnimi Rahden sperman pönnämetelmän vertailu

Alkataulu viikot 37-40

TOIMEKSIANTAJA

Organisaatio TYKS Naistenklinikka, IVF-laboratorio

Työn ohjaaja / yhteysthenkilö Harri Mankonen

Osoite _____

Puhelin 313 2357 Sähköposti harri.mankonen@tyks.fi

Harri Mankonen
HARRI MANKONEN


OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT

Ohjaava opettaja Sanna Virtanen

Puhelin _____ Sähköposti sanna.virtanen@turkuamk.fi

Turun ammattikorkeakoulu
Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku
puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791
posti etunimi.sukunimi@turkuamk.fi

Opinnäytetyön toimeksiantosopimus



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

**OPINNÄYTETYÖN
TOIMEKSIANTOSOPIMUS**

2

OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT*

OHJAUS JA VASTUUT

Vastuu opinnäytetyön tekemisestä ja tuloksista on opiskelijalla. Turun ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjauksesta. Toimeksiantaja sitoutuu antamaan opiskelijan käyttöön kaikki opinnäytetyön tekemisessä tarvittavat tiedot ja aineistot sekä ohjaamaan opinnäytetyötä toimeksiantajaorganisaation näkökulmasta.

OIKEUDET

Opinnäytetyön tekijänoikeus kuuluu tekijälle eli opiskelijalle. Tekijänoikeuden lisäksi myös muiden immateriaalioikeuksien osalta noudatetaan kulloinkin voimassa olevaa kyseessä olevaa oikeutta koskevaa lainsäädäntöä.

TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

Mahdollisesta työsuhteesta, työstä maksettavasta palkki- osta ja työstä mahdollisesti aiheutuvien kustannusten korvaamisesta toimeksiantaja ja opinnäytetyön tekijä sopivat erikseen.

TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Kirjallinen raportti luovutetaan toimeksiantajalle ja asetetaan kirjaston kokoelmiin tai julkaistaan elektronisessa muodossa verkkokirjastossa.

Julkaistava opinnäytetyöraportti on laadittava niin, ettei se sisällä liike- tai ammattisalaisuuksia tai muita julkisuuslaissa (laki viranomaisten toiminnan julkisuudesta) salassa pidettäväksi määrättyjä tietoja, vaan ne jätetään työn tausta-aineistoon. Opinnäytetyön arvioinnissa otetaan huomioon sekä julkaistava että salassa pidettävä osa.

Opinnäytetyön toimeksiantaja ja opiskelija sitoutuvat pitämään salassa kaikki opinnäytetyön tekemisessä ja sitä edeltävissä tai sen jälkeisissä neuvotteluissa esiin tulevat luottamukselliset tiedot ja asiakirjat.

Toimeksiantajan edustajalle varataan mahdollisuus tutustua opinnäytetyöraporttiin viimeistään neljättöistä (14) päivää ennen aiotua julkaisemista. Toimeksiantaja antaa työstä ennen edellä mainittua julkaisemisajankohtaa lausunnon, jossa voidaan määritellä opinnäytetyöraporttiin mahdollisesti sisältyvät liike- tai ammattisalaisuudet, joita ei julkaista.

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksien liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETTYLLÄ TAVALLA

28.8.2013

28.8.2013

Sanna Liikkanen

Opiskelija

Leila Tiilikka

Toimeksiantaja

Leila Tiilikka

TOIMEKSIANTAJA

Koulutusjohtaja

LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA

* Turun ammattikorkeakoulun toiminnan yhtiöittämistä vuoden 2014 alusta valmistellaan. Osakeyhtiön toiminnan allettua tämä sopimus siirtyy Turun AMK:n toiminnan vastaanottavalle yhtiölle.

Turun ammattikorkeakoulu
Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku
puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791
posti: etunimi.sukunimi@turkuamk.fi

TYKS Naistenklinikan hoitosuostumus



Turun yliopistollinen keskussairaala/naistenklinikka

Liite 301a

26.11.12

HOITOSUOSTUMUS

Me allekirjoittaneet _____ ja _____
 nimi _____
 nimi _____

olemme saaneet kirjallista ja suullista informaatiota hoidon tuloksena syntyvän lapsen ja muiden osapuolten oikeudellisesta asemasta sekä käytössä olevista hedelmöityshoitomuodoista, niiden ennusteesta, kustannuksista, sivuvaikutuksista ja komplikaatiomahdollisuuksista.

Suostumme seuraavaan hoitomenetelmään, jossa käytetään meidän omia sukusolujamme tai alkioita:

- | Kyllä | Ei | |
|--------------------------|--------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Inseminaatio on/munasolunkypsytyshoito on ja inseminaatioon |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Oman pakastetun sperman käyttö on hedelmöityshoidossa |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | IVF-/ICSI-hoitoon |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Pakastealkioiden siirtoihin |

Suostumuksemme on voimassa _____ / _____ 20____ saakka.

Suostumuksellemme

- ☐ Emme aseta ehtoja
- ☐ Asetamme seuraavia ehtoja:

- | Kyllä | Ei | |
|--------------------------|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Sukusolujamme tai alkioitamme, joita ei voida käyttää hedelmöityshoidoissa, voidaan käyttää laboratorion laadunvalvonassa ja toiminnan kehittämisessä. |

Olemme tietoisia, että halutessamme yhdessä tai erikseen peruuttaa suostumuksemme, olemme velvolliset tekemään sen kirjallisesti.

Turku _____ / _____ 20____

Allekirjoitus ja nimenselvennys

Allekirjoitus ja nimenselvennys

TYKS:n naistenklinikan edustaja

Tätä sopimusta allekirjoitetaan kolme (3) kappaletta kaikkien osapuolten läsnä ollessa. Kaksi kappaletta annetaan perikunnalle ja yksi säilytetään TYKS:n arkistossa.

Työohje

1. Puresperm 80/40

1. Pipetoidaan 2ml Puresperm *80 putkeen.
2. Lisäksi pipetoidaan, Puresperm*40 (2ml) varovasti putkeen *80 päälle.
3. Pipetoi varovasti liuennutta spermaa (n. 1.5 – 2ml) liuosten päälle.
4. Sentrifugoi 20min /300 x G.
5. Poista pipetillä päällimmäinen nestekerros varovasti pyörivin liikkein. Jätä pelletti ja 4 - 6mm *80. Jos pellettiä ei ole, poista nestekerrokset ja jätä pohjalle n. 0,5ml.
6. Pipetoi pelletin ja *80 päälle 5ml Puresperm *Wash- liuosta. Sekoita pelletti joukkoon.
7. Sentrifugoi 10min /500 x G.
8. Poista Puresperm *Wash ja jätä liuosta mahdollisimman vähän siittiöpelletin päälle. Jos pellettiä ei ole, jätä putken pohjalle 0,25ml liuosta.
9. Lisää siittiöpelletin päälle säilytys liuosta 1ml merkki viivaan asti, taiseksi liuokseksi. Analysoi näyte.

- Sentrifuugi: *Thermo Scientific: Heraeus Megafuge 8*

2. Swim-up

1. Pipetoi 2ml Vitrolife mediumia 14ml putkeen.
2. Pipetoi mediumin alle 2ml spermaa.
3. Nostata näyte huoneen lämmössä 30min.
4. Siirrä viljelynestekerros uuteen putkeen.
5. Lisää päälle 2ml Sperm- mediumia ja sekoita näyte.
6. Sentrifugoi 1800rpm/ 10min.

7. Poista päällimmäinen nestekerros ja lisää sakan päälle 2ml Sperm- mediumia, sekoita.
8. Sentrifugoi 1800rpm/ 10min.
9. Poista päällimmäinen nestekerros ja lisää sakan päälle 1ml viljelynestettä.
10. Nostatus huoneenlämmössä 30min → Siittiöt nousevat viljelyneste kerrokseen.

3. Sokkotesti

Näytteelle tehdään sperma-analyysi ja tämän jälkeen pestään näyte swim-up ja gradienttisentrifugointipesumenetelmällä. Lopuksi tehdään pesujen jälkeiset analyysit.

Henkilökunta tekee omat merkintänsä seuraavasti: henkilökunta kirjaa, ylös alkuperäiset näytetiedot ja merkitsee morfologiselle lasille kirjaintunnisteet. Tietäen kumpi näytteistä on pesty swim-upilla ja gradienttisentrifugointimenetelmällä.

4. Analysointi

- Näytettä sekoitetaan 10-15 min. tai kunnes näyte on liuennut.
- Tarkista agglutinaatio
- Maklerin kammioon 5 µl siemennestettä, lasketaan siittiöt 10 ruudusta. (kolmen laskennan keskiarvo) Mikroskoopissa 20x objektiivilla (200-kertainen suurennos).
- Siittiöiden liikkuvuus A - D:n.

5. Morfologinen määrittäminen

- Värjätyltä lasilta lasketaan pää, keskikappale ja häntä. Arvioidaan normaali rakenne ja muoto, riippumatta mikä arvio on annettu muille osille. Laskenta tehdään 100x öljy-immersio-objektiivilla (1000-kertainen suurennos).
- Laske TZI- arvo.